

University of Groningen

Enhancing the antimicrobial potential of lanthipeptides by employing different engineering strategies

Zhao, Xinghong

DOI:
[10.33612/diss.127409437](https://doi.org/10.33612/diss.127409437)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Zhao, X. (2020). *Enhancing the antimicrobial potential of lanthipeptides by employing different engineering strategies*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.127409437>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had als doel om nieuwe benaderingen te verkennen voor de ontwikkeling van lantibiotica, welke ingezet kunnen worden om zowel planktonische als zich in biofilm bevindende cellen te bestrijden. In lijn met dit doel, is in dit proefschrift tevens een methode beschreven om de substraatspecificiteit van lanthipeptidesynthetases aan te passen door middel van high throughput screening, doelgerichte evolutie.

De opkomst van antibiotica-resistentie onder pathogene bacteriën is een probleem dat in de afgelopen jaren enkel is toegenomen. Het is momenteel de directe oorzaak van meer dan een half miljoen overlijdens per jaar. En, er wordt algemeen aangenomen dat antibioticaresistentie in de toekomst een steeds grotere, dan wel niet de grootste, oorzaak van overlijden gaat zijn. In de bestrijding van dit probleem spelen antimicrobiële stoffen waarop resistentiemechanismen minder snel vat krijgen een belangrijke rol. Stoffen zoals lantibiotica.

Lantibiotica zijn ribosomaal geproduceerde peptiden, in welke door gespecialiseerde enzymen post-translationeel lanthionine bruggen worden geïnstalleerd. Lantibiotica zijn lanthipeptiden die antimicrobiële activiteit vertonen, en lanthipeptiden vallen op hun beurt onder de noemer ribosomaal geproduceerde en posttranslationeel gemodificeerde peptiden (RiPPs). De RiPPs omvatten een zeer breed scala aan gemodificeerde peptiden, gecategoriseerd aan de hand van hun meest definiërende modificatie. In het geval van lanthipeptiden, betreft dit dus de lanthionine bruggen.

Veel lantibiotica hebben goede antimicrobiële activiteit tegen pathogene bacteriën, in sommige gevallen zelfs als deze al resistent zijn tegen gebruikelijke antibiotica. Lantibiotica als duramycine, NVB-302, mutacin 1140 en NAI-107, zijn reeds onderhevig aan klinische tests of hebben bewezen antimicrobiële activiteit *in vivo*. Doordat lantipeptiden ribosomaal worden geproduceerd, en hun modificatie enzymen vaak niet gebonden zijn aan een specifiek substraat, kunnen door middel van genetische recombinatie nieuwe moleculen gevormd worden.

In dit proefschrift worden twee strategieën ingezet om nieuwe lantibiotica te

genereren, door gebruik te maken van biosynthetische enzymen afkomstig uit lanthipeptide systemen (**Hoofdstuk 2 & Hoofdstuk 3**). Een methode om 'high-throughput' selectie toe te kunnen passen werd ontwikkeld om nieuwe aangepaste lanthipeptide synthetases te ontwikkelen (**Hoofdstuk 4**). Tot slot werd het op nanotechnologie gebaseerde Ag@nisin NC ontwikkeld voor biofilm-infection control (**Hoofdstuk 5**).

Het eiwit lipid II is een essentiële precursor in de synthese van bacteriële celwanden, en hierdoor een belangrijk doelwit voor antibiotica. Meerdere lanthipeptiden zijn effectief door zich via hun lanthionine-gestabiliseerde lipid II bindingsdomeinen te hechten aan dit eiwit. In **hoofdstuk 2** wordt het modificatie systeem van lantibioticum nisine gebruikt om een lanthipeptide dat twee lipid II bindingsdomeinen heeft, genaamd TL19. Het peptide bestaat uit het N-terminale lipid II bindingsmotief van nisine, en het C-terminale lipid II bindingsmotief van haloduracine.

Verdere karakterisatie van TL19 onthulde een 64 keer hogere activiteit tegen *E. faecium* dan het lipid II bindingsdomein van nisine op zichzelf. Ook bewees mutagenese van respectievelijk het N-terminale en C-terminale domein dat beide bindingsdomeinen cruciaal zijn voor goede antimicrobiële activiteit. Deze resultaten bewijzen dat een dergelijke aanpak, waarin actieve elementen uit verschillende lantibiotica gecombineerd worden, bruikbaar is in de zoektocht naar nieuwe antibiotica.

Non-ribosomaal geproduceerde peptiden (NRPs) vormen een rijke bron van antibiotica zoals daptomycine, vancomycine, teixobactine, brevicidine en vele anderen. Omdat deze peptiden niet ribosomaal, maar via proteïnogene biosynthese complexen gesynthetiseerd worden, is het moeilijk om van deze peptiden varianten of derivaten te creëren. In **hoofdstuk 3** wordt een geheel nieuwe strategie toegepast om, ribosomaal, structurele replica's te produceren van de NRP brevicidine. Typificerende non-proteïnogene karakteristieken van deze NRP worden nagebootst door modificatie enzymen in te zetten uit het biosynthetische systeem van lanthipeptides, i.e. dehydraties en thioetherringen.

Aan de hand van deze strategie werden in twee rondes antimicrobiële peptiden ontwikkeld die activiteit vertonen tegen de Gram-negatieve bacteriën met een

natuurlijke gevoeligheid voor brevicidine. Dit resultaat demonstreert dat het mogelijk is structurele en functionele nabootsing van NRPs te maken via een ribosomale route gevolgd door posttranslationale modificatie mechanismen van RiPPs. Deze strategie maakt het dus mogelijk om op grote schaal NRP-nabootsende structuren te screenen voor antimicrobiële activiteit tegen relevante pathogenen. De ribosomale aard van de synthesesmethode stelt men in staat om ook varianten en derivaten te ontwikkelen, om de effectiviteit en specificiteit van de peptiden te optimaliseren.

Echter, deze methode is niet zonder nadelen. De naastgelegen aminozuren van residuen welke gemodificeerd dienen te worden, kunnen de modificatieefficiëntie verlagen. Deze beperking vermindert ontwerp mogelijkheden van nieuwe peptiden. In **hoofdstuk 4** wordt gedemonstreerd dat door gebruik van zogenoemde 'surface display' van een HPQF-bevattende streptavidin ligand, selectie kan worden toegepast op een reeks gemuteerde lanthipeptide dehydratases, NisB. Op deze manier is een NisB variant geïsoleerd die ser residuen kan dehydrateren die voorafgegaan worden door een asp residu.

Voor de binding van de door NisB gemodificeerde streptavidin ligand aan streptavidin, is het cruciaal dat de ring in de ligand gevormd is. En, omdat dehydratatie cruciaal is voor ring formatie, kan via surface display geselecteerd worden op actieve dehydratie, en dus actief NisB. Het dan wel niet gemodificeerde peptide wordt via het surface display aan het celoppervlak 'gepresenteerd'. Door met streptavidin-gecoate magnetische beads aan de cellen toe te voegen, kunnen cellen die peptiden met een ring presenteren gescheiden worden. Het succes van deze methode is veelbelovend voor haar toepassing om actieve mutanten uit een groep lanthipeptide synthetases te selecteren.

Wondinfectie kan een dodelijk risico vormen voor patiënten, in het bijzonder wanneer dit leidt tot sepsis. De bestrijding van biofilm-vormende of resistente infectie-veroorzakende bacteriën kan problematisch zijn. Het lanthipeptide nisine, als wel elementaal zilver zijn goedgekeurd door de FDA als een topisch antibioticum. Echter, beide stoffen vertonen onvoldoende activiteit tegen bacteriën in een biofilm, wanneer respectievelijk toegepast. In **hoofdstuk 5**

wordt gedemonstreerd dat silver(Ag)@nisin nanoclusters, met een gemiddelde diameter van 60 nm, een hogere anti-biofilm activiteit hebben dan beide stoffen afzonderlijk. Deze clusters kunnen door 'self-assembly' gesynthetiseerd worden met behulp van een magnetron. Ag@nisin clusters vertonen goede activiteit tegen *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, en *E. coli*, welke allen wondinfecties kunnen veroorzaken. Ook suggereren tests op een menselijke nierepitheel cellijn dat de aanwezigheid van nisine de niertoxiciteit verlaagt van zilvernitraat. De hier beschreven resultaten zijn veelbelovend voor toepassing van metaal@antimicrobieel-peptide-composities in de bestrijding van wondinfecties veroorzaakt door biofilm vormende bacteriën.

